



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115010** (13) **C2**

(51) МПК (2017.01)

A61K 31/4015 (2006.01)

A61P 31/00

A61P 25/02 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2016 11303</p> <p>(22) Дата подання заявки: 14.05.2015</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 28.08.2017</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: P-14-39</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 14.05.2014</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: LV</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 10.02.2017, Бюл.№ 3</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 28.08.2017, Бюл.№ 16</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/IB2015/053554, 14.05.2015</p>	<p>(72) Винахідник(и): Звєйнісє Ліга (LV), Дамброва Майя (LV), Вєїнєрг Грігорій (LV), Ворона Максимс (LV), Калвін Іварс (LV)</p> <p>(73) Власник(и): АКЦІЮ САБЄДРІБА "ОЛАЙНФАРМ", Akciju sabiedriba "Olainfarm", 5 Rupnicu street, LV-2114 Olaine, Latvia (LV)</p> <p>(74) Представник: Кістерський Кирило Арсенійович, реєстр. №207</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO2014005721, A1, 09.01.2014 LAUREN BROOM ET AL, "Neuroprotection by the selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson disease", FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE, ELSEVIER INC, US, vol. 50, no. 5, pages 633-640 LIGA ZVEJNIECE ET AL, "Investigation into Stereoselective Pharmacological Activity of Phenotropil", BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY, (20110720), vol. 109, no. 5, pages 407-412</p>
--	---

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ ХВОРОБ, ОБУМОВЛЕНИХ ПІДВИЩЕНИМ РІВНЕМ ІНДУЦИБЕЛЬНОЇ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ

(57) Реферат:

Винахід належить до нового медичного застосування (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду для лікування патологічних станів, що характеризуються надекспресією гена iNOS, викликаних сепсисом або периферичною невропатією.

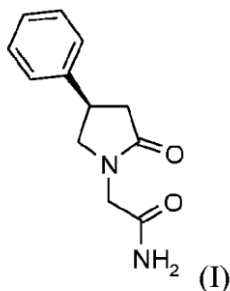
UA 115010 C2

Галузь техніки

Винахід відноситься взагалі до фармакології та медицини. Конкретніше – до відкриття другого медичного застосування (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду для лікування та профілактики хвороб, викликаних біологічним дефіцитом або надлишком оксиду азоту (NO),

наприклад ендотоксичного шоку, сепсису, раку, при трансплантації серця та периферичній

невропатії. Суть винаходу Авторами несподівано було виявлено, що (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід (I) можна успішно застосовувати для лікування патологічних станів, що характеризуються підвищеною експресією індуктибельної синтази оксиду азоту (iNOS), оскільки він дуже ефективно знижує надекспресію гена iNOS.



Було виявлено, що (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід є високоефективним при зниженні індукованої ліпополісахаридом експресії гена iNOS у тканині головного мозку мишей. Даний винахід демонструє, що (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід можна використовувати як новий лікарський засіб для лікування станів, що характеризуються підвищеною експресією гена iNOS, наприклад, сепсису, викликаного ендотоксином, раком, трансплантацією серця, розладів, викликаних токсичними або травматичними факторами. Було також виявлено, що (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід є високоефективним при лікуванні периферичної невропатії, викликаній введенням формаліну. Даний винахід демонструє, що (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід можна використовувати як новий лікарський засіб для лікування станів, що характеризуються підвищеною експресією гена iNOS, наприклад для лікування або профілактики периферичної невропатії.

Стислий опис графічних матеріалів

Фіг. 1 – Кількісний аналіз методом ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) в реальному часі експресії гена індуктибельної синтази оксиду азоту (iNOS) у тканині головного мозку в моделі індукованого ліпополісахаридом септичного шоку у мишей, який демонструє значне зниження індукованої ліпополісахаридом експресії гена iNOS при лікуванні (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамідом.

Фіг. 2 – Вимірювання ректальної температури в моделі індукованого ліпополісахаридом септичного шоку у мишей, які демонструють значне інгібування викликаного ліпополісахаридом гіпотермії при лікуванні (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамідом.

Фіг. 3 А, В – Результати тесту на лизання кінцівки при введенні формаліну (викликана формаліном периферична невропатія), які демонструють значний ефект (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду у фазі II згаданого тесту.

Фіг. 4 А, В – Результати тесту на лизання кінцівки при введенні формаліну (викликана формаліном периферична невропатія), які демонструють майже відсутність ефекту (4R, S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду у фазах I і II згаданого тесту.

Рівень техніки

При таких патологічних станах, як сепсис, гіпертензія, гіпертрофія та серцева недостатність, експресія гена iNOS підвищується (J. L. Balligand, D. Ungureanu-Longrois, W. W. Simmons et al., Journal of Biological Chemistry, 1994, vol. 269, no. 44, 27580-27588; K. Y. Xu, D. L. Huso, T. M. Dawson, D. S. Bredt, L. C. Becker, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, vol. 96, no. 2, pp. 657-662). Сепсис визначається як системна реакція на інфекцію, найчастішою причиною якої є забруднення крові бактеріями. Септичний шок (сепсис з гіпотензією) розвивається у майже половини пацієнтів як ускладнення, причому смертність становить 40-60 % незважаючи на лікування (M. A. Titheradge, Biochem. Biophys. Acta, 1999, 1411, 437-455). Сепсис супроводжується змінами в декількох фізіологічних параметрах. Вони включають вивільнення молекул вторинних месенджерів типу оксиду азоту (NO), які посилюють імунну відповідь, що призводить до метаболічних змін. Крім того, серцево-судинні порушення, наприклад гіпертензія, розширення периферичних кровоносних судин, викликане синдромом

капілярного витоку, та низький кровотік, можуть викликати неадекватну перфузію тканин і поліорганні дисфункції, що призводять до високої смертності (R. C. Bone, C. J. Grodzin, R. A. Balk. *Chest*, 1997, 112, 235-243; P.B. Corrêa, J. A. Pancoto, G. R. Oliveira-Pelegrin, E. C. Cárnio, M. J. Rocha, *Journal of Neuroimmunology*, 2007, 183, (1-2), 17-25). Наявні на сьогоднішній день дані

5 переконливо показують, що оксид азоту є ключовим медіатором розширення кровоносних судин і стійкої до катехоламінів гіпотонії, яка виникає при септичному шоку (Rees D. D..., *Biochem. Soc. Trans.*, 1995, 23, 1025-1029).

Сепсис лікують як стан, що являє собою небезпеку для життя і потребує термінової медичної допомоги, антибіотиками широкого спектру дії та розчинами (0,9 % NaCl). Оскільки всі

10 пацієнти різні і причин сепсису багато, не кожне доступне лікування підходить для кожного пацієнта. Тим не менш, смертність пацієнтів з тяжким перебігом сепсису або септичним шоком становить приблизно 40-60 %, причому найвищі показники смертності у літніх людей (C. R. Wira, K. Dodge, J. Sather, J. Dziura, *West J. Emerg. Med.*, 2014, 15(1), 51-59). Дослідження 2006 року показало, що ризик смерті від сепсису збільшується на 7,6 % з кожною годиною, яка проходить

15 до початку лікування (Kumar A., Roberts D., Wood K. E., Light B., Parrillo J. E., Sharma S., Suppes R., Feinstein D., Zanotti S., Taiberg L., Gurka D., Kumar A., Cheang M., *Crit. Care Med.*, 2006, 34(6), 1589-96). Таким чином, це свідчить про недостатню ефективність сучасних методів лікування та потребу в нових цілеспрямованих лікарських засобах.

Останні дослідження показали багатообіцяючу ефективність інгібіторів синтази оксиду азоту (NOS) в моделях сепсису. У пацієнтів із септичним шоком було проведено багатоцентрове, рандомізоване, плацебо-контрольоване подвійне сліпе дослідження неселективного інгібітора синтази оксиду азоту Nω-нітро-L-аргінін-метилового ефіру (L-NAME). Результати фази II

20 дослідження були обнадійливими: зменшення рівнів нітратів у плазмі в групі лікування пов'язали із зменшеною потребою у судинозвужувальних речовинах, попередньою регресією шоку та поліпшенням судинного опору (Bakker J., Grover R., McLuckie A., Holzapfel L., Andersson J., Lodato R., Watson D., Grossman S., Donaldson J., Takala J., *Crit. Care Med.*, 2004, 32(1), 1-12; Watson D., Grover R., Anzueto A., Lorente J., Smithies M., Bellomo R., Gubtopalli K., Grossman S., Donaldson J., Le Gall J. R., *Crit. Care Med.*, 2004, 32(1), 13-20). Однак фаза III дослідження була завершена достроково через збільшення смертності в групі лікування, причому більша частка

25 смертей від дисфункції серця відноситься до легеневої гіпертензії (E. Abraham., M. Singer, *Mechanisms of Sepsis-Induced Organ Dysfunction and Recovery*. Springer, 2007).

Було виявлено, що оксид азоту (NO) може стимулювати зростання пухлин і метастазів в результаті сприяння міграційній, інвазивній та ангіогенній здатностям пухлинних клітин, що також можуть викликатися активацією циклооксигенази (COX)-2. Таким чином, інгібітори NOS, COX або обох можуть відігравати терапевтичну роль при певних видах раку (Lala P. K., Chakraborty C., *Lancet Oncol.*, 2001, 2(3), 149-56). Селективна експресія індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS) у печінці викликає інсулінову резистентність печінки, а також порушену

35 інсулінову сигналізацію, що призводить до гіперглікемії та гіперінсулінемії (Shinozaki S. L., Choi C. S., Shimizu N., Yamada M., Kim M., Zhang T., Shiota G., Dong H. H., Kim Y. B., Kaneki M., *J. Biol. Chem.*, 2011, 286(40), 34959-75), а експресія рекомбінантної iNOS у мозкових артеріях зменшує вазомоторну здатність реагувати на агоністи і судинозвужувального, і судинорозширювального засобів (Eguchi D. L., D'Ucio L. V., Wambi C., Weiler D., Kovesdi I., O'Brien T., Katusic Z. S., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2002, 283(6), H2560-6). iNOS може бути важливим медіатором при глютенівій хворобі (I. Daniels, D. Cavill, I. A. Murray, R.G. Long, *Clinica Chimica Acta*, 2005, Volume 356, Issues 1-2, 134-142). Крім того, доведено, що рівень iNOS підвищується при

45 кровотечі і що оксид азоту з індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS) бере участь у постреанімації від шоку при ураженнях легенів і печінки. Інгібування iNOS селективним інгібітором N6-(іміноетил)-L-лізин приводило до значного зменшення геморагічного шоку після ураження печінки (Tirpoe G. L., Leung T. M., Liong E., So H., Leung K. M., Lau T. Y., Tom W. M., Fung M. L., Fan S. T., Nanji A. A. *Histol. Histopathol.*, 2006, 21(11), 1157-65).

Синтез і вивільнення оксиду азоту (NO) через фермент індукцибельна синтаза оксиду азоту (iNOS) із астроцитів і мікроглії – це шлях, при якому нейрозапалення безпосередньо впливає на нейронний апоптоз. Оксид азоту відіграє вирішальну роль у функції мозку взагалі, і, вважають, що він відіграє важливу роль у багатьох нейропатологічних процесах, в тому числі при травмах,

55 хворобі Альцгеймера та церебральній ішемії (R. S. Clark, P. M. Kochanek, M. A. Schwarz, J. K. Schiding, D. S. Turner, M. Chen, T. M. Carlos, S. C. Watkins, *Pediatr. Res.*, 1996, 39, 784; Y. Vodovotz, M. S. Lucia, K. C. Flanders, L. Chesler, Q. W. Xie, T. W. Smith, J. Weidner, R. Mumford, R. Webber, C. Nathan, et al., *J. Exp. Med.*, 1996, 184, 1425-33; K.M. Boje, P. K. Arora, *Brain Res.*, 1992, 587, 250-6). На сьогодні існує значна кількість даних, які підтверджують, що оксид азоту (NO) є молекулою міжклітинного месенджера, яка, як вважають, бере участь в синаптичній

60

передачі в центральній та периферичній нервових системах (J. Garthwaite, S. L. Charles, R. Chess-Williams. *Nature*, 1988, 336, 385-388; D. S. Bredt, S.H. Snyder, *Neuron*. 1992, 8, 3-11). Виявили, що в спинному мозку NO відіграє певну роль в модуляції ноцицептивної передачі і пластичності. Нейрональна NO-синтаза сконцентрована у поверхневому задньому розі
 5 спинного мозку (N. J. Dun, S. L. Dun, S. Y. Wu, U. Forstermann, H. H. Schmidt, L. F. Tseng. *Neuroscience*, 1993, 54, 845-857; G. Terenghi, V. Riveros-Moreno, L. D. Hudson, N. B. Ibrahim, J. M. Polak. *J. Neurol. Sci.*, 1993, 118, 34-37; S. Saito, G. J. Kidd, B. D. Trapp, T.M. Dawson, D. S. Bredt, D. A. Wilson, R. J. Traystman, S. H. Snyder, D. F. Hanley. *Beuroscience*, 1994, 59, 447-456). Введення формаліну викликало довготривале збільшення експресії синтази оксиду азоту в
 10 спинному мозку (T. Herdegen, S. Rudiger, B. Mayer, R. Bravo, M. Zimmermann, *Mol. Brain Res.*, 1994, 22, 245-258; H. H. Lam, D. F. Hanley, B. D. Trapp, S. Saito, S. Raja, T. M. Dawson, H. Yamaguchi, *Neurosci. Lett.*, 1996, 210, 201-204). Системне та інтратекальне введення інгібіторів синтази оксиду азоту (NO-синтази), таких як N ω -нітро-L-аргінін-метиловий ефір (L-NAME) або 7-нітроіндазол (7-NI), зменшує ноцицептивні реакції на викликану формаліном периферичну
 15 невропатію у мишей та щурів (P. K. Moore, R. C. Babbedge, P. Wallace, Z. A. Gaffen, S. L. Hart, Br. J. Pharmacol., 1993, 108, 296-297; A. K. Roche, M. Cook, G. L. Wilcox, K. C. Kajander, Pain, 1996, 66, 331-341). Донори оксиду азоту, введені інтратекально, не тільки викликають зменшення латентності відсмикування хвоста або відсмикування лапи (T. Inoue, T. Mashimo, S. Shibuta, I. Yoshiya, J. Neurol. Sci., 1997, 153, 1-7; Y.-X. Tao, R. A. Johns, Eur. J. Pharmacol., 2000, 392, 141-
 20 145), але і сприяють викликаним формаліном ноцицептивним формам поведінки в другій фазі (S. Shibuta, T. Mashimo, P. Zhang, A. Ohara, I. Yoshiya, J. Neurol. Sci., 1996, 141, 1-5). Крім того, введення формаліну в задню лапку викликає двофазну спінальну секрецію метаболітів оксиду азоту (K. Okuda, C. Sakurada, M. Takahashi, T. Yamada, T. Sakurada, Pain, 2001, 92, 107-115). Ці результати показують, що NO залучений в центральному механізмі периферичних невропатій,
 25 викликаних гіпералгезією на рівні спинного мозку.

Було виявлено, що селективні інгібітори iNOS, такі як аміногуанідин гідрохлорид і AR-C102222, зменшують периферичну ноцицепцію у фазі II тесту на лизання кінцівки при введенні формаліну (S. P. Dudhgaonkar, D. Kumar, A. Naik, A. R. Devi, D. U. Bawankule, S. K. Tandan, *European Journal of Pharmacology*, 2004, 492, 2-3, 117-122; C. J. LaBuda, M. Koblish, P. Tuthill, R.
 30 E. Dolle, P. J. Little. *European Journal of Pain*, 2006, 10, (6), 505-512). У фазі II тесту на лизання кінцівки при введенні формаліну дають лікарські засоби, які застосовують для лікування периферичної невропатії, наприклад габапентин, прегабалін і амітриптилін (H. Gustafsson, K. Flood, O. G. Berge, E. Brodin, L. Olgart, C. O. Stiller. *Experimental Neurology*, 2003, 182, (2), 427-434; H. Gustafsson, J. Sandin. *European Journal of Pharmacology*, 2009, Volume 605, 1-3, 103-108;
 35 J. Sawynok, A. Reid. Pain, 2001, 93, 1, pages 51-59). Периферична невропатія пов'язана з надмірними нейродегенеративними процесами у периферичній нервовій системі та ЦНС, що сприяє ініціації та підтримці постійного болю (Ellis A., Bennett D. L., Br. Anaesth., 2013, Jul; 111 (1), 26-37). Периферична невропатія, результат пошкодження нерва, у пацієнтів часто викликає слабкість, оніміння та біль, як правило, в руках і ногах, але вона також може проявлятися і в
 40 інших частинах тіла. Вважають, що це обумовлено патологічними змінами, або пошкодженням в нейронах у периферичній або центральній нервовій системі (Freynhagen R., Bennett M. I., BMJ, 2009, 339, b3002). Є декілька лікарських засобів, застосовуваних для лікування периферичної невропатії; однак у багатьох пацієнтів не досягається задовільної реакції або вони відчувають серйозні побічні ефекти. Для лікування периферичної невропатії можна застосовувати такі
 45 лікарські засоби, як трициклічні антидепресанти, SNRI (селективний інгібітор зворотного захоплення серотоніну-норепінефрину), антиконвульсивні засоби і опіоїдні анальгетики, але вони не обумовлюють повного поліпшення якості життя для пацієнтів через серйозні побічні ефекти та помірну клінічну ефективність (таблиця 1). Тому істотне значення має розробка нових фармацевтичних препаратів, які зменшують і попереджують периферичну невропатію більш
 50 ефективно, ніж існуючі лікарські засоби.

Таблиця 1

Лікарські засоби для лікування периферичної невропатії

Лікарський засіб	Побічні ефекти	Переваги	Недоліки
Амітриптилін (трициклічні антидепресанти)	Антихолінергічні побічні ефекти, седативний ефект, кардіотоксичність, знижений судомний порог	Усталена ефективність, приймання один раз на день, недорогий, ефективний при порушеннях сну	Часто погано переноситься, особливо літніми пацієнтами
Дулоксетин (SNRI*)	Нудота, підвищений кров'яний тиск (КТ) (клінічно незначний), рідко гепатотоксичність	Немає антихолінергічних побічних ефектів або кардіотоксичності, легке титрування, приймання один раз на день, одна й та сама доза ефективна при депресії, тривожності та невропатичному болю; схвалено FDA* при болючій діабетичній невропатії	Дорогий, обмежений багаторічний досвід застосування при невропатичному болю
Венлафаксин (SNRI*)	Побічний шлунково- кишковий ефект, підвищена частота серцевих скорочень і підвищений КТ, порушення на ЕКГ* (рідко)	Немає антихолінергічних побічних ефектів, приймання один раз на день (при формі з уповільненим вивільненням); одна й та сама доза ефективна при депресії, тривожності та невропатичному болю	Дорогий, обмежений багаторічний досвід застосування при невропатичному болю
Габапентин (антиконвульсивний засіб)	Запаморочення, сонливість, головний біль, діарея, сплутаність свідомості, нудота, периферичний набряк, збільшення ваги	Немає антихолінергічних побічних ефектів, немає печінкового метаболізму, немає кардіотоксичності	Повільне титрування, приймання три рази на день, нелінійна кінетика
Прегабалін (антиконвульсивний засіб)	Сонливість, запаморочення, набряк, збільшення ваги	Більш швидке, більш просте титрування порівняно з габапентином, схвалено FDA при болючій діабетичній невропатії	Дорогий, обліковий препарат за переліком V, приймання двічі на день
Лідокаїн для місцевого застосування (місцевий анестетик)	Подразнення ділянки нанесення	Незначна системна абсорбція	Ефективний тільки при локалізованому болю, дорогий
Мета дон (опіоїдний анальгетик)	Седативний ефект, запор, нудота, блювота, сухість у роті, гіпогонадизм, імунологічні зміни, гіпералгезія,	Швидкий початок дії, ефективний для багатьох різних типів болю, хороша ефективність	Вірогідність зловживання препаратом/ застосування не за призначенням, обмежений

Лікарські засоби для лікування периферичної невропатії

Лікарський засіб	Побічні ефекти	Переваги	Недоліки
	підвищений ризик падінь і когнітивні проблеми в літньому віці		багаторічний досвід застосування при невропатичному болю
Трамадол (опіоїдний анальгетик)	Нудота, блювота, потіння, сухість у роті, запаморочення, седативний ефект, знижений судомний поріг	Швидкий початок знеболювання, менший адитивний потенціал, ніж у сильних опіоїдів; доступний препарат пролонгованої дії, ефективний для багатьох різних типів болю	Ризик серотонінового синдрому, обмежений багаторічний досвід застосування, певний ризик зловживання препаратом/ застосування не за призначенням

* SNRI – селективний інгібітор зворотного захоплення серотоніну-норепінефрину; КТ – кров'яний тиск; ЕКГ – електрокардіограма; FDA – Управління з контролю якості харчових продуктів і лікарських засобів

5 Тому пошук ефективних і безпечних інгібіторів iNOS має істотне значення.

Опис винаходу

Згідно з даним винаходом (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід (CAS-номер 949925-07-9 (номер хімічної речовини або препарату за реферативним журналом Chemical Abstracts System) можна застосовувати для лікування станів, що характеризуються підвищеною експресією індукційної синтази оксиду азоту (iNOS), оскільки він дуже ефективно знижує надекспресію гена iNOS. Це виявили цілком несподівано, оскільки рацемічний (4R, S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід (CAS-номер 77472-70-9) використовують в медицині людини як антидепресант, захисний агент проти стресу та модулятор локомоторної активності (D. Mashkovsky. "Medicinal drugs", Moscow, MEDITSINA Publishers, 1988; part I, pp. 70-79, 122-123), а енантімерно чистий (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід (CAS-номер 949925-07-9) був описаний щодо його застосування як антидепресанта, захисного агента проти стресу, модулятора локомоторної активності, м'язового релаксанта та анальгетика (WO2007104780).

Авторами було виявлено, що (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід є високоефективним при зниженні індукованої ліпополісахаридом експресії гена iNOS у тканині головного мозку мишей, тоді як (4R, S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід виявляє тенденцію до зниження дії ліпополісахаридів. В цьому відношенні чистий R-енантімер має несподівану та відповідну перевагу порівняно і з рацематом, і з S-енантімером. Даний винахід показує, що (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід можна використовувати як новий лікарський засіб для лікування станів, що характеризуються підвищеною експресією гена iNOS, наприклад, сепсису, викликаного ендотоксином, раком, трансплантацією серця, розладів, викликаних токсичними або травматичними факторами.

Було виявлено, що (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід є високоефективним при лікуванні периферичної невропатії, викликаній введенням формаліну. Було також виявлено, що дія (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду базується на несподіваному і неочікуваному зменшенні індукованої ліпополісахаридом експресії гена iNOS у тканині головного мозку мишей. Даний винахід демонструє, що (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід можна використовувати як новий лікарський засіб для лікування станів, що характеризуються підвищеною експресією гена iNOS, наприклад для лікування або профілактики периферичної невропатії.

Відомо, що (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід не викликає побічних ефектів на організм при застосуванні в дозі не більше 250 мг/кг при інтраперитонеальному введенні (Zvejniece L., Svalbe B., Veinberg G., Grinberga S., Vorona M., Kalvinsh I., Dambrova M. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol., 2011, 109 (5), 407-12). (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід повністю виводиться з організму в неметабілізованій формі. Тому (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід є перспективним лікарським засобом для лікування сепсису та інших станів з підвищеним рівнем індукційної синтази оксиду азоту (iNOS), без серйозних і небезпечних для життя побічних ефектів.

Ефективність (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду при лікуванні патологічних станів, що характеризуються підвищеним рівнем iNOS, наприклад сепсису і периферичної невропатії, була точно підтверджена результатами тестів, спрямованих на оцінку:

а) викликані введенням ліпополісахариду надекспресії гена iNOS та гіпотермії в тваринних моделях гострого септичного шоку (M. A. Titheradge, *Biochem. Biophys. Acta*, 1999, 1411, 437-455);

б) поведінкової реакції тварин у тесті на лизання кінцівки при введенні формаліну (Carter M., Shieh J. C. *Guide to Research Techniques in Neuroscience*, 2010, Burlington, MA: Academic Press, pp. 51-2).

Встановлено, що бактеріальний ендотоксин, ліпополісахаридний компонент зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій, є головним медіатором показників захворюваності та смертності, характерних для бактеріального грамнегативного септичного шоку. Експериментальне введення ендотоксину тваринам імітує симптоми септичного шоку. Введення ліпополісахариду (LPS) підвищує експресію індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS), при цьому підвищена експресія iNOS призводить до тривалого продукування великих кількостей оксиду азоту (NO), які, як передбачають, опосередковують зміни в судинній системі і пошкодження тканин, які спостерігаються при септичному шоку і синдромі поліорганної недостатності (M. A. Titheradge, *Biochem. Biophys. Acta*, 1999, 1411, 437-455). Під час ендотоксемії експресія iNOS і збільшення мРНК iNOS та білка спостерігали в багатьох типах клітин, в тому числі в ендотеліальних клітинах, макрофагах, клітинах Купфера, гепатоцитах, гладком'язових клітинах судин, клітинах нирки, хондроцитах, кардіоміоцитах, панкреатичних острівках та фібробластах (S. M. Morris, T. R. Billiar. *Am. J. Physiol.*, 1994, 266, 829-839; C. Nathan. *FASEB J.*, 1992, 6, 3051-3064; M. Salter, R. G. Knowles, S. Moncada. *FEBS Lett.*, 1991, 291, 145-149).

У свавців введення LPS викликає гіпотермію в результаті зменшення метаболічного утворення тепла та викликає поведінку пошуку холоду, навіть якщо температура їхнього тіла знижується (A. A. Romanovsky, M. C. Almeida, D. M. Aronoff, A. L. Ivanov, J. P. Konsman, A. A. Steiner, V. F. Turek, *Frontiers in Bioscience*, 2005, 10, pp. 2193-2216; A. Y. Rudaya, A. A. Steiner, J. R. Robbins, A. S. Dragic, A. A. Romanovsky, *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2005, 289 (5), pp. R1244-R1252). Первісно прийнято, що викликана ліпополісахаридом гіпертермія, як ознака септичного шоку, – це опосередкована мозком реакція, і вона викликається в результаті вивільнення вільних радикалів типу оксиду азоту та криогенних цитокінів з LPS-процесуючих органів, що є потенційно летальним (R. S. Saia, E. C. Carnio. *Life Sciences*, 2006, 79 (15), pp. 1473-1478; M. J. Kluger, *Physiological Reviews*, 1991, 71 (1), pp. 93-127).

Результати, представлені на графіках фіг. 1 і фіг. 2, показують, що (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід при введенні разом з LPS ефективно зменшував експресію гена iNOS та інгібував викликану LPS гіпотермію у мишей. В той же час (4R, S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід та (4,S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід не запобігли індукованій LPS надекспресії гена iNOS. Крім того, (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід зменшував реакції у тесті на лизання кінцівки при введенні формаліну *in vivo* (фіг. 3A, 3B), тоді як рацемічний (4R, S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід був неефективним (фіг. 4A, 4B).

Отримані експериментальні дані свідчать про значну різницю в здатності (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду зменшувати експресію гена iNOS порівняно з (4,S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамідом. Ці дані говорять про ефективність (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду в лікуванні патологічних станів, що характеризуються значно підвищеною експресією гена iNOS, наприклад викликаних бактеріальними ліпополісахаридами гіпотермії та септичного шоку. Цей винахід також наводить докази того, що фармацевтичні композиції на основі (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду, але не (4,S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду, можна застосовувати як відповідний лікарський препарат для лікування інших хвороб і станів з патологічно підвищеними рівнями iNOS, наприклад певних форм раку, збільшення інсулінової резистентності печінки, а також порушеної інсулінової сигналізації, які призводять до гіперглікемії та гіперінсулінемії, зменшеної вазомоторної здатності реагувати на агоністи і судинозвужувального, і судинорозширювального засобів в церебральних артеріях, а також для лікування глютенної хвороби та периферичних невропатій.

Фармацевтичні композиції

Згідно з даним винаходом (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід може бути застосований у фармацевтичних композиціях у формі будь-яких фармацевтично прийнятних

солей, сольватів, кон'югатів, гідратів, співкристалів і поліморфів. Слід розуміти, що в даному описі будь-які посилання на (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід також відносяться і до таких солей, сольватів, кон'югатів, гідратів, співкристалів і поліморфів.

(4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід може бути застосований у фармацевтичних композиціях або препаратах, які містять цю сполуку у поєднанні з фармацевтично прийнятним носієм. Термін "носій", застосовуваний до фармацевтичних композицій даного винаходу, відноситься до розріджувача, допоміжної речовини або несучого середовища, з яким вводять активну сполуку. Такими фармацевтичними носіями можуть бути стерильні рідини, наприклад вода, сольові розчини, водні розчини декстрази, водні розчини гліцерину та олії, в тому числі олії, що включають нафту, олії тваринного, рослинного або синтетичного походження, наприклад арахісова олія, соєва олія, мінеральне масло, кунжутна олія і т.п. Відповідні фармацевтичні носії описані в довіднику Remington's Pharmaceutical Sciences (E. W. Martin, 18th Edition).

Відповідні фармацевтично прийнятні носії включають інертні тверді наповнювачі або розріджувачі та стерильні водні або органічні розчини. Таким чином, для перорального введення описувані сполуки можна поєднувати з відповідним твердим або рідким носієм або розріджувачами для виготовлення капсул, таблеток, порошків, сиропів, розчинів, суспензій тощо. Фармацевтичні композиції можуть, за необхідності, містити додаткові компоненти, наприклад смакові агенти, підсолоджувачі, допоміжні речовини тощо. Для парентерального введення описувані сполуки можна поєднувати зі стерильними водними або органічними середовищами для виготовлення ін'єкційних розчинів або суспензій. Ін'єкційні розчини можна потім вводити внутрішньовенно, внутрішньочеревно, підшкірно або внутрішньом'язово.

Запропоновані активні інгредієнти, разом з одним або більшою кількістю традиційних ад'ювантів, носіїв або розріджувачів, можна включати у фармацевтичні композиції та їх стандартні лікарські форми, і в такій формі їх можна застосовувати у вигляді твердих речовин, наприклад таблеток, покритих оболонкою або без неї, або наповнених капсул, або у вигляді рідин, наприклад розчинів, суспензій, емульсій, еліксирів або капсул, наповнених цими речовинами, – все для перорального застосування; у формі супозиторіїв або капсул для ректального введення або у формі стерильних ін'єкційних розчинів для парентерального введення (в тому числі внутрішньовенного або підшкірного). Такі фармацевтичні композиції та їх стандартні лікарські форми можуть включати відомі або нові інгредієнти у відомих або спеціальних пропорціях, з додатковими активними сполуками чи елементами або без них, при цьому сухі такі лікарські форми можуть містити будь-яку відповідну ефективну кількість активного інгредієнта, пропорційну передбачуваному діапазону денних доз, який буде застосовуватися.

Для перорального застосування у формі таблетки або капсули активний компонент лікарського засобу може бути поєднаний з нетоксичними, фармацевтично прийнятними допоміжними речовинами, наприклад зв'язуючими речовинами (наприклад, прежелатинізованим кукурудзяним крохмалем, полівінілпіролідом або гідроксипропілметилцелюлозою); наповнювачами (наприклад, лактозою, цукрозою, глюкозою, манітолом, сорбітолом та іншими відновлюючими або невідновлюючими цукрами, мікрокристалічною целюлозою, сульфатом кальцію або вторинним кислим фосфатом кальцію); ковзними речовинами (наприклад, стеаратом магнію, тальком або діоксидом кремнію, стеариноювою кислотою, стеарилфумаратом натрію, бегенатом гліцерину, стеаратом кальцію тощо); розпушувачами (наприклад, картопляним крохмалем або натрію крохмальгліколятом) або змочувальними агентами (наприклад, лаурилсульфатом натрію), барвниками та смаковими агентами, желатином, підсолоджувачами, природними та синтетичними камедями (наприклад, аравійською камеддю, трагакантом або альгінатами), буферними солями, карбоксиметилцелюлозою, поліетиленгліколем, воском тощо. Для перорального застосування в рідкій формі інгредієнти лікарського засобу можуть бути поєднані з нетоксичними фармацевтично прийнятними інертними носіями (наприклад, етанолом, гліцерином, водою), суспендуючими речовинами (наприклад, сорбітним сиропом, похідними целюлози або гідрогенізованими їстівними жирами), емульгаторами (наприклад, лецитином або аравійською камеддю), неводними несучими середовищами (наприклад, мигдальним маслом, жирними складними ефірами, етиловим спиртом або фракціонованими рослинними оліями), консервантами (наприклад, метил- або пропіл-п-гідроксибензоатами або сорбіноювою кислотою) і т.п. Для стабілізації лікарських форм можна також додавати стабілізатори, наприклад антиоксиданти (бутилоксианізол (BHA), бутилгідрокситолуол (BHT), пропілгалат, аскорбат натрію або лимонну кислоту). На таблетки можна наносити оболонку відомими в цій галузі способами.

Застосування запропонованих сполук при виготовленні лікарського засобу для лікування тварини для пригнічення аномальної експресії гена iNOS здійснюють відомим способом, що передбачає змішування ефективної кількості запропонованої винаходом сполуки з фармацевтично прийнятним розріджувачем, допоміжною речовиною або носієм, і застосування певного методу лікування, фармацевтичних композицій та використання запропонованої сполуки при виготовленні лікарського засобу.

Способи введення та лікарські форми

Завдяки їх високому ступеню активності та низькій токсичності, а також завдяки забезпеченню дуже сприятливого терапевтичного індексу, запропоновані активні компоненти можна вводити в організм суб'єкта, наприклад тварини (в тому числі людини), який того потребує, для лікування, купірування, модуляції, зменшення інтенсивності, тимчасового послаблення або ліквідації ознаки або стану, який є сприйнятливим до цих активних компонентів, або типової ознаки або стану, згаданого в іншому місці в даній заявці, необов'язково одночасно, одночасно або разом з однією або більшою кількістю фармацевтично прийнятних допоміжних речовин, носіїв або розріджувачів, і необов'язково у формі фармацевтичної композиції з ними, будь-яким шляхом введення: пероральним, ректальним або парентеральним (в тому числі внутрішньовенно та підшкірно) або в деяких випадках навіть місцево, в ефективній кількості. Відповідні діапазони доз становлять 1-1000 мг на день, 10-500 мг на день і 50-250 мг на день, в залежності, як правило, від конкретного режиму приймання, форми, в якій вводиться, показання, згідно з яким таке приймання призначене, хворого суб'єкта та маси тіла хворого суб'єкта, вибору та досвіду курируючого лікаря або ветеринара. Термін "терапевтично ефективна", застосовуваний до дози або кількості, означає кількість сполуки або фармацевтичної композиції, яка в результаті виявляє достатню задану активність при введенні в організм живої тварини, яка цього потребує. Запропоновані активні компоненти можна застосовувати перорально, місцево, парентерально або через слизову (наприклад, букально, інгаляцією або ректально) у вигляді композицій в стандартних лікарських формах, які містять традиційні нетоксичні фармацевтично прийнятні носії. Як правило, перевагу віддають пероральному введенню. Активні компоненти можна приймати перорально у вигляді капсули, таблетки тощо (див. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition (2000), Philadelphia, PA). Пероральні лікарські засоби можна вводити у вигляді носія з контрольованим вивільненням, в тому числі систем з контрольованою дифузєю, осмотичних пристроїв, матриць з контрольованою розчинністю та руйнованих/розкладних матриць.

Запропоновані композиції можна доставляти шляхом парентерального, наприклад внутрішньовенного, інтрацеребровентрикулярного, підшкірного, інтраперитонеального, внутрішньом'язового або внутрішньошкірного введення, прямою ін'єкцією, шляхом, наприклад, болюсної ін'єкції або безперервної інфузії. Композиції для ін'єкції можуть бути представлені у вигляді лікарської форми, наприклад в ампулах або в багатодозових контейнерах, з доданням консервантом. Композиції можуть мати такі форми, як суспензії, розчини або емульсії у масляних або водних середовищах, і можуть містити допоміжні речовини, наприклад суспендуючі, стабілізуючі та/або диспергуючі агенти. Як варіант, активний інгредієнт може бути у формі порошку для розведення перед застосуванням відповідним несучим середовищем, наприклад стерильною апірогенною водою.

Запропоновані композиції також можна виготовляти для ректального введення, наприклад у вигляді супозиторіїв, або мікроклізм з утримуванням (наприклад, які містять традиційні супозиторні основи, наприклад масло какао або інші гліцериди).

Запропоновані композиції також можна вводити в мікросферах або мікрокапсулах, наприклад виготовлених з полігліколевої кислоти/молочної кислоти (ПГМК).

Рідкі препарати для перорального введення можуть мати форму, наприклад, розчинів, сиропів, емульсій або суспензій, або вони можуть являти собою сухий продукт для розведення водою або іншим відповідним несучим середовищем перед застосуванням.

Препарати для перорального введення можуть бути виготовлені відповідним чином для забезпечення контрольованого або відстроченого вивільнення активної сполуки. Активні препарати також можна вводити у вигляді ліпосомальних систем доставки, наприклад у вигляді маленьких одношарових везикул, великих одношарових везикул і багатшарових везикул. Ліпосоми можуть складатися з багатьох фосфоліпідів, наприклад холестерину, стеариламіну або фосфатидилхолінів, як добре відомо.

Запропоновані лікарські засоби можна також доставляти, використовуючи моноклональні антитіла, як індивідуальні носії, до яких приєднані молекули сполуки.

Активні лікарські засоби можна також з'єднувати з розчинними полімерами як самонавідними носіями лікарського засобу. Такими полімерами можуть бути полівінілпіролідон,

пірановий співполімер, полігідроксипропілметакриламідфенол, полігідроксиетиласпартамідфенол або поліетиленоксидполілізин, заміщений пальмітоїльними залишками.

Крім того, активний лікарський засіб може бути з'єднаний з класом біорозкладаних полімерів, корисних для досягнення контрольованого вивільнення лікарського засобу, наприклад полімолочною кислотою, полігліколевою кислотою, співполімерами полімолочної та полігліколевої кислоти, полі-епілон-капролактоном, полігідроксимаєсною кислотою, поліортоєфіром, поліацетатами, полігідропіранами, поліціаноакрилатами та поперечно зшитими або амфіпатичними блок-співполімерами гідрогелей.

Для інгаляційного введення запропоновані терапевтичні засоби можна зручно доставляти у формі спрею-аерозолі з упаковки, що перебуває під тиском, або розпилювача, з використанням відповідного пропеленту, наприклад дихлордифторметану, трихлорфторметану, дихлортетрафторетану, діоксиду вуглецю або іншого відповідного газу. У разі застосування у вигляді аерозолі під тиском можна використовувати дозуючий пристрій, забезпечений клапаном для доставки дозованої кількості. Для використання в інгаляторі або інсуфляторі можуть бути виготовлені капсули або картриджі, наприклад із желатину, що містять порошкову суміш сполуки та відповідну основу порошку, наприклад лактозу або крохмаль.

При необхідності описувані композиції можуть бути представлені у вигляді упаковки або дозуючого пристрою, який може містити одну або більше стандартних лікарських форм, які містять активний інгредієнт, в деяких випадках різного дозування, і який діє як порційна упаковка. Ця упаковка може, наприклад, включати металеву або пластикову фольгу, наприклад у вигляді блістерної упаковки.

Як тут описано, дозу компонентів в запропонованих композиціях визначають таким чином, щоб гарантувати, що ця доза, яку вводять безперервно або з інтервалами, не буде перевищувати кількість, визначену після аналізування результатів у тестованих тварин і конкретного стану пацієнта.

Конкретна доза звичайно змінюється в залежності від методу дозування, певних факторів, що стосуються пацієнта або тварини, наприклад віку, маси тіла, статі, чутливості, харчування, періоду застосування дози, лікарських засобів, застосовуваних у взаємодії, серйозності хвороби. Відповідну рекомендовану дозу і кількість разів її приймання за певних умов можна визначати тестом на основі вищеописаних індексів, але їх можна уточнювати і з рештою визначати відповідно до рішення лікаря і обставин кожного пацієнта (віку, загального стану, тяжкості симптомів, статі тощо) згідно зі стандартними клінічними методами.

Токсичність і терапевтичну ефективність запропонованих композицій можна визначити стандартними фармацевтичними процедурами на експериментальних тваринах, наприклад шляхом визначення LD_{50} (дози, летальної для 50 % популяції) та ED_{50} (дози, терапевтично ефективною для 50 % популяції). Співвідношення між терапевтичним і токсичним ефектами і є терапевтичним індексом, який можна виразити як співвідношення ED_{50}/LD_{50} . Перевагу віддають композиціям, які виявляють великі терапевтичні індекси.

Репрезентативні фармацевтичні композиції

За допомогою традиційно застосовуваних розчинників, допоміжних речовин і носіїв фармацевтичним композиціям можна надавати форму таблеток, таблеток, вкритих оболонкою, капсул, розчинів для крапельного введення, супозиторіїв, ін'єкційних та інфузивних препаратів тощо, і терапевтично застосовувати, вводячи перорально, ректально, парентерально та додатковими шляхами. Нижче наведені репрезентативні необмежуючі фармацевтичні композиції.

а) Таблетки, придатні для перорального введення, які містять активний інгредієнт, можна виготовляти відомими способами таблетування.

б) Для супозиторіїв можна використовувати будь-яку звичайну супозиторну основу для включення в неї відомою процедурою активного інгредієнта, такою основою може бути поліетиленгліколь, який є твердим при нормальній кімнатній температурі, але який плавиться при температурі тіла.

в) Для парентеральних (в тому числі внутрішньовенних або підшкірних) стерильних розчинів застосовують активний інгредієнт разом з традиційними інгредієнтами в звичайних кількостях, наприклад з хлоридом натрію та бідистильованою водою в достатній кількості, за традиційною процедурою, наприклад фільтрацією, асептичним наповненням в ампули або пляшки для внутрішньовенних крапельниць, та стерилізацією в автоклаві.

Інші відповідні фармацевтичні композиції будуть очевидними для фахівців в цій галузі.

Приклади композицій

Наступні приклади композицій наведені лише для ілюстрації, і їх жодним чином не слід розглядати як обмеження даного винаходу.

Композиція 1. Таблетка

Відповідна композиція для таблетки, яка містить 10 мг активного інгредієнта, має наступний склад:

активний інгредієнт	10 мг
лактоза	61 мг
мікрокристалічна целюлоза	25 мг
тальк	2 мг
стеарат магнію	1 мг
колоїдний діоксид кремнію	1 мг.

Композиція 2. Таблетка, вкрита оболонкою

Інша відповідна композиція для таблетки, що містить 100 мг активного інгредієнта, має наступний склад:

активний інгредієнт	100 мг
полівінілпіролідон, поперечно зшитий	10 мг
картопляний крохмаль	20 мг
полівінілпіролідон	19 мг
стеарат магнію	1 мг
мікрокристалічна целюлоза	50 мг

Оболонка для покриття, забарвлена. Матеріал покривної оболонки складається з:

гіпромелози	10 мг
мікрокристалічної целюлози	5 мг
тальку	5 мг
поліетиленгліколю	2 мг
кольорових пігментів	5 мг.

10 Композиція 3. Капсула

Відповідна композиція для капсули, яка містить 50 мг активного інгредієнта, має наступний склад:

активний інгредієнт	50 мг
кукурудзяний крохмаль	26 мг
двоосновний фосфат кальцію	50 мг
тальк	2 мг
колоїдний діоксид кремнію	2 мг

Розміщена в желатиновій капсулі.

Композиція 4. Розчин для ін'єкції

15 Відповідна композиція для ін'єкційного розчину має наступний склад:

активний інгредієнт	10 мг
хлорид натрію	скільки потрібно
вода для ін'єкцій	1,0 мл.

Композиція 5. Рідкий пероральний розчин

Відповідна композиція для 1 літру перорального розчину, який містить 200 мг активного інгредієнта в одному мілілітрі суміші, має наступний склад:

активний інгредієнт	200 мг
сахароза	250 мг
глюкоза	300 мг
сорбітол	150 мг
апельсинова смакова добавка	10 мг
барвник	скільки потрібно
очищена вода	додають до 100 мл.

Композиція 6. Рідкий пероральний розчин

20 Інша відповідна композиція для 1 літру рідкої суміші, що містить 500 мг активного інгредієнта в одному мілілітрі суміші, має наступний склад:

активний інгредієнт	500 мг
сахароза	750 мг
глюкоза	300 мг
сорбітол	150 мг
апельсинова смакова добавка	10 мг
барвник	скільки потрібно
очищена вода	додають до 100 мл.

Композиція 7. Розчин для аерозольного застосування

180 г розчину для аерозольного застосування містять:

активний інгредієнт	10 г
олеїнова кислота	5 г
етанол	81 г
очищена вода	9 г
тетрафторетан	75 г

15 мл цього розчину вводять в алюмінієві аерозольні банки, забезпечують кришками з дозуючим клапаном, випускають повітря тиском 3,0 бар.

5 Композиція 8. Розчин для системи трансдермальної доставки

100 г розчину містять:

активний інгредієнт	10,0 г
етанол	57,5 г
пропіленгліколь	7,5 г
диметилсульфоксид	5,0 г
гідроксиетилцелюлоза	0,4 г
очищена вода	19,6 г

1,8 мл цього розчину поміщають на фліс, покритий фольгою з адгезійним шаром. Цю систему закривають захисним покриттям, яке треба буде зняти перед використанням.

Композиція 9. Наночастинки

10 г наночастинок полібутилціаноакрилату містять:

активний інгредієнт	1,00 г
полоксамер	0,10 г
бутилціаноакрилат	8,75 г
манітол	0,10 г
хлорид натрію	0,05 г

10 Н НСІ/етанол як полімеризаційному середовищі. Ці наночастинки в суспензії під кінець ліофілізують під вакуумом.

Приклади

Наступні приклади використані для ілюстрації процедур здійснення винаходу. Ці приклади жодним чином не слід розглядати як обмеження винаходу.

15 Тварини

Самців мишей лінії ICR вагою 25-30 г придбали в Лабораторії експериментальних тварин, Ризький університет ім. Страдіня (Рига, Латвія), і помістили в стандартні умови (21-23 °C, відносна вологість 65 % \pm 10 %, 12 годинний цикл світла-темряви) з необмеженим доступом до стандартної їжі (дієта R70, компанія Lactamin AB, Швеція) та води. Процедури експерименту здійснювали згідно з рекомендаціями, наведеними в Директиві ЄС 2010/63/EU, і відповідно до національного законодавства і політики; всі процедури були схвалені Етичним комітетом захисту тварин продовольчо-ветеринарної служби Латвії в Ризі. Для усунення систематичних відмінностей між групами лікування, тварини були довільно віднесені до відповідних експериментальних груп (12 тварин у кожній групі для тесту з введенням формаліну і 6 тварин у кожній групі для тесту з введенням LPS). Для виключення суб'єктивних факторів під час оцінювання всі процедури експерименту здійснювали сліпим методом.

Приклад 1. Вплив (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду на індуковану ліпополісахаридом (LPS) надекспресію гена iNOS у тканині головного мозку мишей.

30 Експресію гена iNOS стимулювали однією інтраперитонеальною ін'єкцією LPS в дозі 20 мг/кг за 6 годин до взяття зразка тканини. Контрольні тварини отримували інтраперитонеальну ін'єкцію сольового розчину (0,9 % NaCl). Для визначення миттєвого впливу (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду, (4S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду та (4R, S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду на індуковану LPS надекспресію гена iNOS, LPS вводили одночасно ін'єкціями з (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамідом, (4S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамідом та (4R, S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамідом в дозі 50 мг/кг або сольовим розчином. Мишей декапітували через 6 годин після введення зазначених речовин.

40 Тканину мозку після взяття зразків одразу заморожували в рідкому азоті та зберігали при -80 °C. Тотальну РНК з тканини мозку виділяли, використовуючи TRI-Reagent (Sigma, USA) згідно з протоколом виробника. Зразки розбавляли водою при об'ємному співвідношенні 1:20, і якість і кількість виділеної тотальної РНК аналізували шляхом вимірювання поглинання при 230, 260 та 280 нм за допомогою спектрофотометра μ QuantTM (BioTek). Зразки розбавляли водою до

досягнення концентрації 0,5 мкг/мл і синтезували одноланцюгову кДНК, використовуючи набір High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, USA), дотримуючись інструкцій виробника. Кількісний аналіз методом полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскриптазою (RT-PCR) для iNOS здійснювали шляхом змішування синтезованої кДНК (розбавленої водою при об'ємному співвідношенні 1:10), відповідних праймерів і суміші SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems™, USA) та аналізували в системі Applied Biosystems Prism 7500 згідно з протоколом виробника. Рівні транскриптів β-актину конститутивного генного продукту кількісно визначали для кожного зразка, і дані ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) представляли у вигляді кількості транскриптів на кількість молекул β-актинової мРНК.

Інтраперитонеальне введення LPS через 6 годин викликало значне збільшення транскрипції гена iNOS у тканині мозку мишей приблизно у 12 разів порівняно із сольовим розчином (фіг. 1). Лікування (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамідом в дозі 50 мг/кг значно зменшувало індуковану LPS експресію гена iNOS. Лікування (4S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамідом і (4R, S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамідом в дозі 50 мг/кг несподівано не зменшило експресію гена порівняно з групою, в якій вводили LPS. Більш того, ефективність (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду щодо експресії гена iNOS значно відрізнялася від ефективності (4S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду (фіг. 1).

Приклад 2. Вплив (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду на індуковану LPS гіпотермію у мишей

Гіпотермію викликали інтраперитонеальною ін'єкцією ліпополісахариду (LPS) в дозі 20 мг/кг. Контрольним тваринам вводили інтраперитонеальною ін'єкцією сольовий розчин (0,9 % NaCl). Для визначення миттєвого впливу (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду на індуковану LPS гіпотермію, LPS вводили ін'єкцією одночасно з (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамідом у дозі 50 мг/кг або сольовим розчином. Ректальну температуру тварин визначали термометром (Thermalert TH-5, USA) за 5 хвилин до введення LPS або сольового розчину та через 6 годин після введення.

Згідно з даними фіг. 2, інтраперитонеальне введення LPS в дозі 20 мг/кг з сольовим розчином через 6 годин зменшувало ректальну температуру піддослідних тварин. Одночасне інтраперитонеальне введення LPS в дозі 20 мг/кг з (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамідом у дозі 50 мг/кг значно інгібувало індуковану LPS гіпотермію.

Приклад 3. Вплив (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетаміду на лизання кінцівки при введенні формаліну

Тест на лизання кінцівки при введенні формаліну здійснювали, як описано вище у Zvejniece et al., 2006 (Zvejniece L., Muceniece R., Krigere L., Dambrova M., Klusa V. Z. Pharmacol. Biochem. Behav. 2006, 85 (2), 287-91). Стисло, мишей обережно стримували і 30 мкл розчину формаліну (1,5 % в сольовому розчині) вводили підшкірно у підшовну поверхню правої задньої лапки за допомогою мікрошприца з голкою 27-го калібру. Кожну мишу потім поміщали в окрему камеру спостереження з прозорого плексигласу (30×20×30 см), і загальний час лизання задньої лапки кожної миші реєстрували і підраховували у послідовних 5-хвилинних інтервалах упродовж 50 хвилин. Реєстрування часу лизання починали одразу (перша фаза) і продовжували 5 хвилин. Пізня фаза (друга фаза) починалась приблизно через 15-20 хвилин після введення формаліну і тривала до 35 хвилин.

Попереднє лікування (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамідом у дозі 50 мг/кг привело до значного інгібування часу реакції лизання лапки, викликаной формаліном у фазі II експерименту. Як видно на фіг. 3А і 3В, (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід у дозі 50 мг/кг викликав значне зменшення, на 46 %, лизання лапки у фазі II (фіг. 3В). Однак попереднє лікування (4R, S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамідом у дозі 50 мг/кг не зменшило часу лизання лапки у фазах I і II тесту на викликане формаліном лизання кінцівки порівняно з групою, в якій вводили сольовий розчин (фіг. 4АБ 4В).

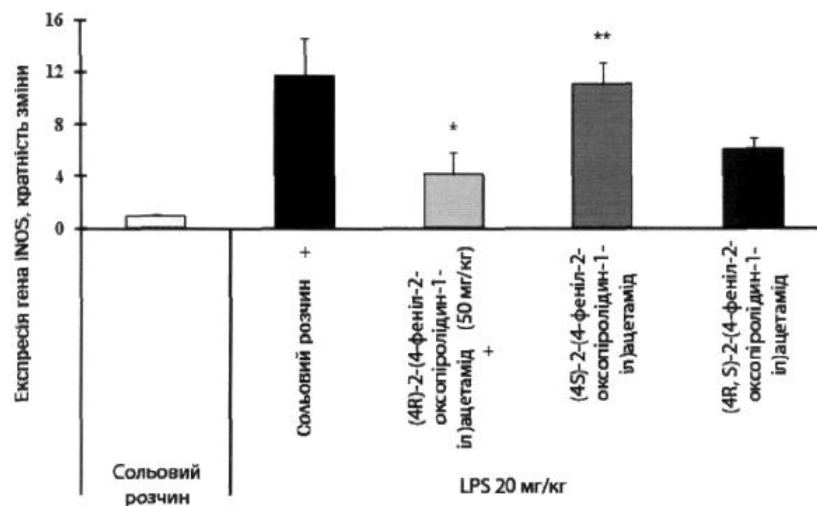
Фахівцям в даній галузі стануть очевидними різні модифікації винаходу додатково до описаних тут варіантів. Слід розуміти, що такі модифікації входять в об'єм даного винаходу.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

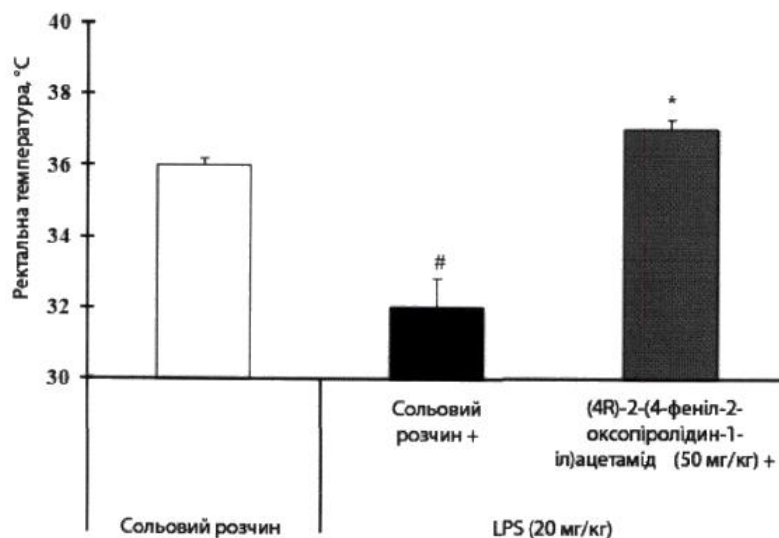
1. Застосування фармацевтичної композиції, що містить активну сполуку (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід або її фармацевтично прийнятну сіль, для лікування або профілактики патологічного стану, який характеризується підвищеною експресією гена iNOS, викликаного сепсисом або периферичною невропатією.

2. Застосування за п. 1, яке **відрізняється** тим, що фармацевтична композиція призначена для лікування або профілактики сепсису.

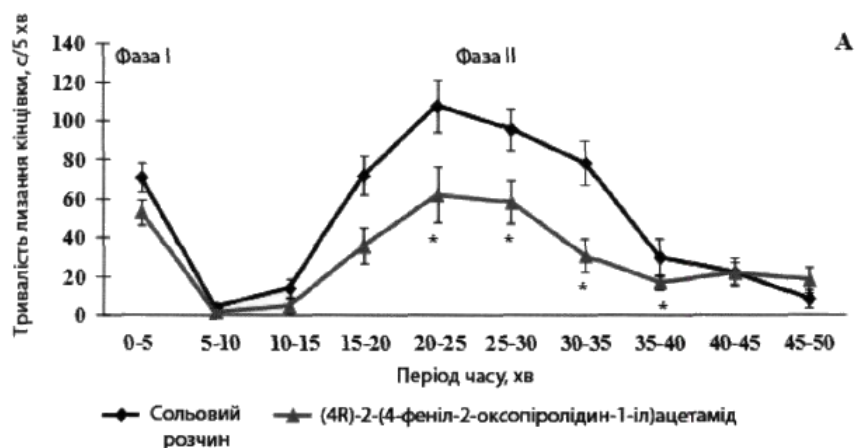
3. Застосування за п. 1, яке **відрізняється** тим, що фармацевтична композиція призначена для лікування або профілактики периферичної невропатії.
4. Застосування за п. 1, яке **відрізняється** тим, що фармацевтична композиція додатково містить фармацевтично прийнятний носій або розріджувач.
5. Застосування фармацевтичної композиції для лікування або профілактики сепсису у суб'єкта, що цього потребує, причому композиція містить терапевтично ефективну кількість (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід або його фармацевтично прийнятної солі.



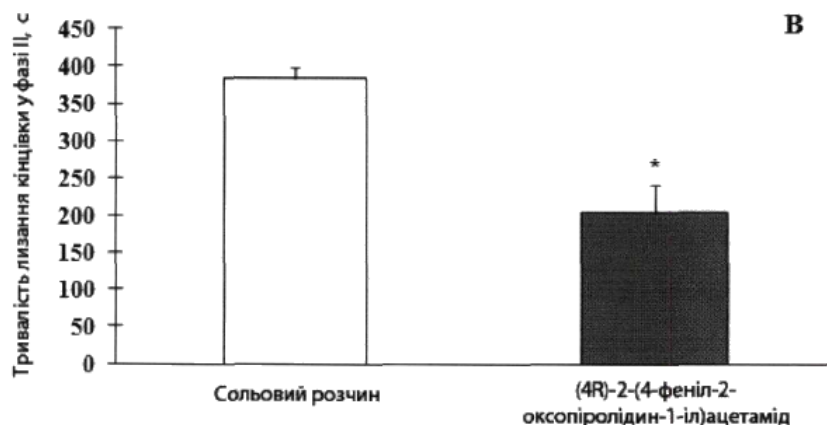
Фіг. 1. Кількісний аналіз методом ПЛР в реальному часі експресії гена iNOS в тканині головного мозку. Дані представлені як середнє значення \pm SEM (стандартна похибка середнього) ($n=6$). * $p < 0,05$ порівняно з групою, в якій вводили LPS + сольовий розчин. ** $p < 0,05$ порівняно з групою, в якій вводили (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід + LPS.



Фіг. 2. Вимірювання ректальної температури. Вимірювання здійснювали через 6 годин після введення LPS (20 мг/кг). Дані представлені як середнє значення \pm SEM ($n=6$). * $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою, в якій вводили LPS. # $p < 0,05$ в контрольній групі, в якій вводили LPS, порівняно з контрольною групою, в якій вводили сольовий розчин.



Фіг. 3А. Тест на лизання кінцівки, викликане введенням формаліну. (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід вводили інтраперитонеально в дозі 50 мг/кг за 60 хвилин до ін'єкційного введення формаліну. Лизання лапки, в яку зробили ін'єкцію, записували як загальний час (сек) на кожні 5 хвилин упродовж загальної тривалості 50 хвилин.



Фіг. 3В. Фаза II тесту на лизання кінцівки, викликаного введенням формаліну. (4R)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід вводили інтраперитонеально в дозі 50 мг/кг за 60 хвилин до ін'єкційного введення формаліну. Час, витрачений на лизання лапки, в яку зробили ін'єкцію, у фазі II тесту визначали з 15-ої хвилини по 35-у хвилину після введення формаліну. Дані представлені як середнє значення \pm SEM (n=12).

* $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

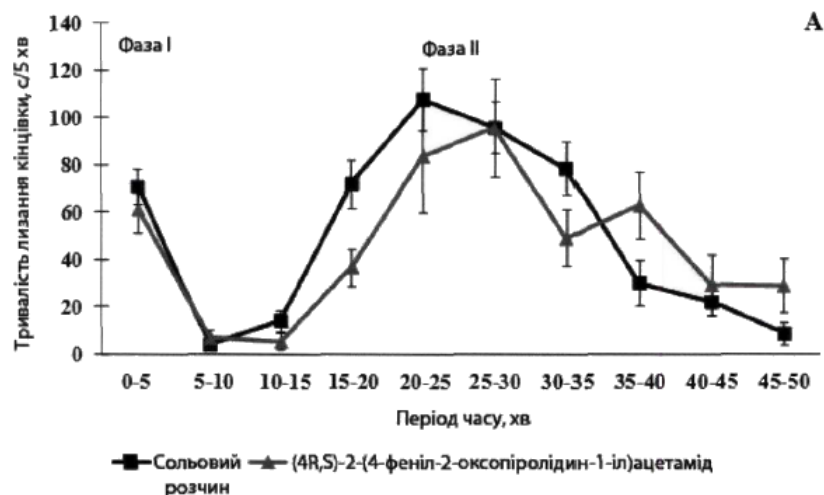


Fig. 4A. Тест на лизання кінцівки, викликане введенням формаліну. (4R, S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід вводили інтраперитонеально в дозі 50 мг/кг за 60 хвилин до ін'єкційного введення формаліну. Лизання лапки, в яку зробили ін'єкцію, записували як загальний час (сек) на кожні 5 хвилин упродовж загальної тривалості 50 хвилин.

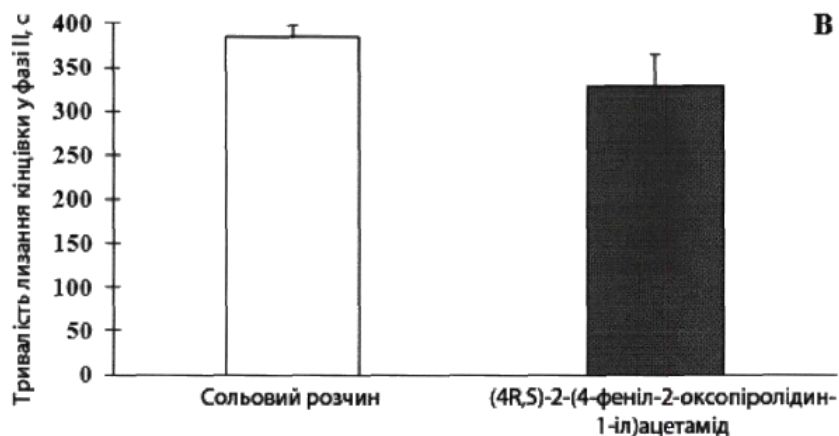


Fig. 4B. Фаза II тесту на лизання кінцівки, викликаного введенням формаліну. (4R, S)-2-(4-феніл-2-оксопіролідін-1-іл)ацетамід вводили інтраперитонеально в дозі 50 мг/кг за 60 хвилин до ін'єкційного введення формаліну. Час, витрачений на лизання лапки, в яку зробили ін'єкцію, у фазі II тесту визначали з 15-ої хвилини по 35-у хвилину після введення формаліну. Дані представлені як середнє значення \pm SEM (n=12).

Комп'ютерна верстка О. Рябо

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601